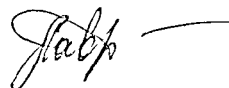


САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи



ЛАВРОВА  
Марина Викторовна

**РАЗРАБОТКА МИКРОФЛОИДНОЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ  
ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ  
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Специальность 02 00 02 – аналитическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук



00307 1309

Санкт-Петербург  
2007

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета

**Научный руководитель.** доктор физико-математических наук,  
профессор

**Ганеев Александр Ахатович**

**Официальные оппоненты.** доктор химических наук, профессор

**Карцова Людмила Алексеевна**

кандидат химических наук, доцент

**Борзенко Андрей Геннадьевич**

**Ведущая организация:**

Государственный научно-

исследовательский институт

биологического приборостроения

Защита диссертации состоится «31» мая 2007 г

В 17 час 00 мин на заседании диссертационного совета Д-212 232 37 по защите диссертации на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб , 7, Менделеевский центр, БХА

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им А М Горького по адресу 199134, Санкт-Петербург, Университетская наб , д 7/9

Автореферат разослан «27» апреля 2007 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета



А Г Цапсуева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность** Существующие методы анализа в области биоаналитической химии и медицинской диагностики развиваются по пути повышения производительности, экспрессности, селективности и экономичности анализа. Наиболее эффективное решение возникающих на этом пути задач может быть достигнуто при применении микрофлюидных аналитических систем (МФАС). МФАС привлекают повышенный интерес благодаря своим уникальным характеристикам, таким как интегрирование нескольких стадий анализа в едином устройстве, повышение производительности анализа, снижение расхода реагентов и ускорение аналитических реакций.

За последние пять лет продемонстрированы успешные приложения МФАС в таких областях как генетический и клинический анализ, капиллярный электрофорез и жидкостно-жидкостная экстракция. Особую актуальность приобрели МФАС для осуществления полимеразно-цепной реакции (ПЦР), традиционно используемой при проведении геномных исследований, а также в клинической диагностике для выявления и изучения инфекционных заболеваний. Стандартное оборудование для проведения ПЦР имеет такие ограничения как низкие скорости термоциклирования, неравномерность распределения температур внутри реакторов, наличие температурного градиента нагреваемой зоны и большой расход дорогостоящих реагентов на единичный анализ. Перечисленные параметры ограничивают производительность, экспрессность и селективность анализа. Реализация ПЦР в микроструктурах микрофлюидных чипов позволяет устранить эти ограничения за счет выбора материала микрочипа с высокими коэффициентами теплопроводности и создания высокой плотности расположения микрореакторов малого объема, что увеличивает скорости нагрева/охлаждения ПЦР смеси, а также за счет повышения равномерности распределения температуры внутри нагреваемой зоны, что в совокупности приводит к увеличению экспрессности, производительности и селективности анализа. Наиболее современным способом определения ДНК является метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющий получить кинетическую кривую ПЦР, на основании которой осуществляют количественное определение исходной концентрации ДНК в пробе, что недоступно для других методов детектирования продуктов ПЦР. Микрофлюидные аналитические системы, в случае выбора материалов, не препятствующих чувствительному флуоресцентному определению, способны реализовать ПЦР-РВ, что существенно повышает экспрессность определения ДНК и позволяет количественно определять исходную концентрацию ДНК в пробе, что привело к возникновению нового класса микрофлюидных ПЦР систем.

Несмотря на высокий интерес к разработкам и исследованию подобных систем, существует большое количество нерешенных задач, требующих новых подходов и дополнительной оптимизации. В первую очередь к ним относится модификация поверхности микрореакторов для устранения ингибирования ПЦР, возникающее из-за поверхностной сорбции компонентов смеси на внутреннюю поверхность микрореакторов главным образом вследствие высокого отношения площади поверхности к объему. Вторая задача, требующая серьезного внимания - разработка эффективных и экспрессных способов регенерации микрочипа после проведения

ПЦР для многократного использования микрофлюидной аналитической системы, что позволит минимизировать стоимость анализа и сделать ее доступней для генетических исследований. Большинство исследователей не продемонстрировали оптимальных решений описанных проблем применительно к ПЦР-РВ. Существующие микрофлюидные ПЦР системы ограничены или низкой плотностью микрореакторов или низкими скоростями нагрева/охлаждения реакционной смеси, вызванных использованием полимерных материалов при изготовлении микрочипов. Поэтому, большинство существующих микрофлюидных аналитических ПЦР систем имеют ограниченные возможности, не сочетающие все достоинства МФЧ.

Таким образом, необходимы теоретически обоснованные экспериментальные исследования по разработке новой мультиреакторной микрофлюидной аналитической системы, позволяющей экспрессно осуществлять ПЦР-РВ, изучение процессов термоциклирования в микрореакторах чипа, а также оценка и минимизация влияния поверхностных явлений на протекание ПЦР в микрореакторах микрочипа и оптимизация условий проведения ПЦР-РВ.

**Цель настоящей работы** – Разработка мультиреакторной микрофлюидной аналитической системы для экспрессного, селективного и высокочувствительного определения ДНК методом ПЦР-РВ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработать и оптимизировать топологию ПЦР микрочипов, способы ввода проб, методы герметизации микрочипа и регенерации поверхности микрореакторов после проведения ПЦР
- разработать и оценить методы пассивации поверхности микрореакторов ПЦР микрочипа для увеличения чувствительности определения ДНК
- разработать мультиреакторную микрофлюидную аналитическую систему, позволяющую проводить экспрессное определение ДНК, и оптимизировать аналитические параметры этой системы
- создать методику экспрессного определения ДНК методом ПЦР-РВ в микрореакторах ПЦР микрочипа и продемонстрировать ее аналитические возможности на примере диагностических тест-систем

**Научная новизна.** Создан мультиреакторный стеклянно-кремниевый ПЦР микрочип с высокой плотностью расположения микрореакторов. Разработаны способы одновременного ввода проб в микрореакторы и герметизации, позволяющие предотвратить движение и испарение проб при проведении термоциклирования. Предложена методика пассивации, основанная на нанесении полимерного покрытия, которая позволяет минимизировать сорбцию компонентов ПЦР смеси, а также предотвратить смешение проб при вводе в микрореакторы. Предложена методика экспрессной регенерации микрочипа после проведения ПЦР, которая позволяет многократно использовать микрочип. Предложен и продемонстрирован способ оптимизации экспрессности метода ПЦР в режиме реального времени, основанный на критериях количественного определения ДНК. На основании проведенных исследований создана мультиреакторная микрофлюидная аналитическая система ПЦР-РВ, позволяющая существенно ускорить количественное определение ДНК методом ПЦР-РВ.

**Практическая значимость работы** Разработана методика экспрессного определения ДНК в созданной микрофлюидной аналитической системе, охарактеризованы ее правильность и воспроизводимость Показано, что в созданной микрофлюидной ПЦР-РВ системе достигнута теоретически максимально возможная эффективности реакции, при этом минимально обнаружимое количество молекул ДНК составляет 1 копия/микрореактор Продолжительность ПЦР-анализа сокращена до 18 минут, что в 45 раза быстрее, чем при проведении ПЦР на стандартном оборудовании, с режимом амплификации, рекомендованном производителем Предложенная методика регенерации поверхности микрочипа после проведения ПЦР позволила снизить трудоемкость и стоимость анализа

На основе настоящей работы ведется проектирование анализатора нового типа, обеспечивающего проведение ПЦР-РВ в условиях мобильной лаборатории, и экспрессную идентификацию ДНК в 16 пробах в течение 18 мин, при расходе реагентов не более 3 мкл на пробу В результатах исследований проявили заинтересованность Министерство Обороны РФ и Министерство Чрезвычайных Ситуаций РФ, ЦНИИ Эпидемиологии, организации аналитического приборостроения

**Положения, выносимые на защиту**

- 1 Топология микрофлюидного чипа для проведения ПЦР-РВ и способы экспрессного ввода проб и герметизации микрочипа Способ экспрессной регенерации поверхности микрочипов после проведения ПЦР для многократного использования
- 2 Методика пассивации поверхности Результаты исследования сорбции компонентов ПЦР смеси
- 3 Мультиреакторная микрочиповая аналитическая система для определения ДНК методом ПЦР-РВ Аналитические характеристики созданной системы, их применимость для экспрессного, высокочувствительного и селективного определения ДНК
4. Методика экспрессного определения ДНК методом ПЦР-РВ, позволяющая с высокой чувствительностью проводить количественный анализ ДНК

**Публикации и апробация работы.** Материалы диссертации опубликованы в 3 статьях и 7 тезисах докладов на конференциях Основные результаты работы докладывались на следующих конференциях Colloquium Spectroscopicum Internationale CSI XXXIII (2003, Granada, Spain), V Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003» (2003, С-Петербург), Всероссийская конференция «Аналитика России-2004» (2004, Москва), «Pittcon`2005» (2005, Orlando (FL), USA), 2-я Всероссийская конференция «Аналитические приборы» (2005, С-Петербург), Международная конференция по аналитической химии «ICAS-2006» (2006, Москва)

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка литературы Работа изложена на 155 страницах машинописного текста, включая 52 рисунка, 22 таблицы и 136 наименований в списке цитируемой литературы

## КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Во введении дано обоснование актуальности создания микрочиповых аналитических систем для экспрессного и селективного определения ДНК методом ПЦР-РВ. Здесь же сформулирована цель работы, указаны ее новизна и практическая значимость.

### 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Теоретическая часть работы состоит из трех частей. В *первой части* кратко рассмотрены основные операции, проводимые в микроструктурах чипов при проведении биохимических исследований. Отражены характерные преимущества МФАС и показано, что такие системы могут использоваться в биоаналитической химии для пробоподготовки биологических объектов, при разделении смесей аналитов с последующим их определением и для экспрессного проведения таких процессов как иммуноферментная или полимеразно-цепная реакции. В *второй части* отражены основные положения метода ПЦР и показана его высокая значимость для целей геномных исследований и медицинской диагностики. Приведены основные ограничения классических методов термоциклирования и отражены преимущества детектирования результатов ПЦР анализа методом ПЦР-РВ. В *третьей части* обзора критически рассмотрены методы и материалы изготовления ПЦР микрочипов с точки зрения создания экспрессных и высокочувствительных микрофлюидных ПЦР систем. Оценены созданные к настоящему времени микрофлюидные ПЦР системы, их достоинства и недостатки, по таким критериям как количество одновременно осуществляемых реакций, методы детектирования и достигнутые скорости нагрева/охлаждения. Особое внимание уделено критической оценке предложенных методов пассивации поверхности микрореакторов для предотвращения сорбции компонентов ПЦР смеси на внутреннюю поверхность микрореакторов.

На основании обзора литературы была сформулирована цель настоящего исследования, заключающаяся в разработке мультиреакторной микрофлюидной аналитической системы с флуоресцентным детектором для экспрессного, селективного и высокочувствительного определения ДНК методом ПЦР-РВ.

### 2 ПЦР МИКРОЧИП СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТОПОЛОГИИ

В качестве подложки микрофлюидного ПЦР чипа был выбран кремний в силу высокого коэффициента теплопроводности и доступности технологии изготовления, а в качестве стеклянной покровной пластины выбрано стекло, что вызвано необходимостью флуоресцентного детектирования ампликонов методом ПЦР-РВ. Микрофлюидные чипы, использованные в настоящей работе, были изготовлены методом анизотропного химического травления микроструктур (микрочипы, микрореакторы) в кремниевых пластинах, толщиной 400 мкм с последующим припеканием покровных пластин стекла. В чипах топологии 1 и 2 (см. рис. 1 а) было обнаружено образование пузырьков воздуха при заполнении микрочипа растворами, что было вызвано перепадом глубин и расширением при переходе от микроканала к реактору. Микрочипы этих топологий характеризовались низкой плотностью

расположения микрореакторов (1 микрореактор на  $136 \text{ мм}^2$ ), причем выходы микрореакторов были объединены в общий микроканал слива, наличие которого приводило к перемешиванию проб при проведении термоциклирования. Отметим, что большие линейные размеры микрочипа ( $60 \times 40 \text{ мм}$ ), на котором располагалось относительно небольшое количество микрореакторов, приводили к удорожанию стоимости анализа. Также было обнаружено, что большие линейные размеры входных/выходных отверстий ( $2 \times 2 \text{ мм}$ ) вызывали испарение проб при термоциклировании.

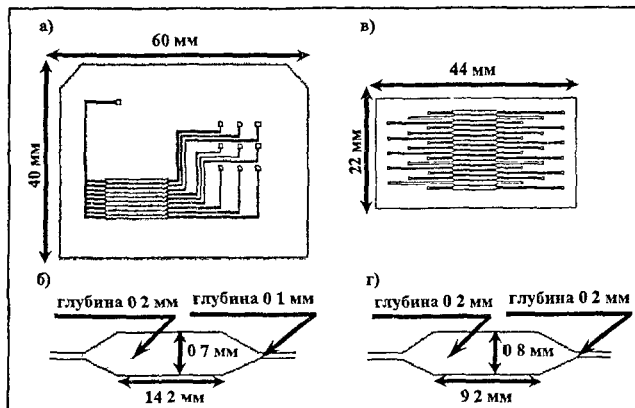


Рис 1 Топологии микрофлюидных ПЦР чипов. а Микрофлюидный ПЦР чип топологии 2 б Форма и размеры микрореактора чипа топологии 2 в Микрофлюидный ПЦР чип топологии 3 г Форма и размеры микрореактора чипа топологии 3.

В результате оптимизации был разработан ПЦР микрочип топологии 3 (см рис 1 в, г) с 16 гидродинамически несвязанными реакторами, в котором по сравнению с вышерассмотренными топологиями произведено устранение перепад глубин между каналом и реактором, увеличена плотность расположения микрореакторов в 1.5 раза, уменьшены геометрические размеры микрочипа в 2.5 раза, линейные размеры входных/выходных отверстий сокращены в 4 раза. Все это позволило устранить образование пузырьков воздуха при вводе проб в микрореакторы, предотвратить смещение и испарение проб при термоциклировании, повысить производительность и снизить себестоимость анализа.

### 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК МЕТОДОМ ПЦР-РВ В МИКРОРЕАКТОРАХ ПЦР МИКРОЧИПА, ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДИКИ

Глава посвящена разработкам экспериментальных установок, для реализации ПЦР-РВ в микрореакторах ПЦР микрочипа и для визуализации данных ПЦР методом гель-электрофореза, описанию используемых модельных растворов, реактивов и методик, а также используемой модели вычисления порогового цикла ПЦР-РВ.

Первая часть главы посвящена *системе флуоресцентного детектирования* (см рис 2), в которой применена эцифлуоресцентная оптическая схема, что позволило равномерно осветить изучаемые объекты и максимально компактизировать установку.

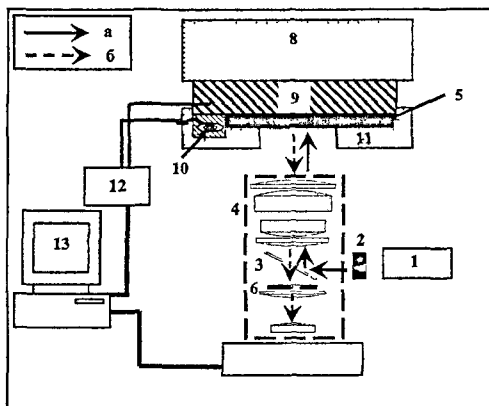


Рис 2 Экспериментальная установка для термоциклирования и флуоресцентного детектирования 1-светодиод, 2, 6- светофильтры; 3-дихроичное зеркало, 4- объектив, 5- ПЦР микрочип, 7- цифровая ПЗС-камера, 8- радиатор, 9- элемент Пельтье, 10- термодатчик, 11- картридж микрочипа, 12- плата микроконтроллера; 13- компьютер Стрелками показаны потоки возбуждающего (а) и флуоресцентного (б) излучения

На основании спектральных характеристик используемых при постановке ПЦР красителей (SYBR Green I и флуорофора FAM), были выбраны спектральные характеристики элементов системы детектирования. Источником возбуждения флуоресценции служил твердотельный светодиод 1, для фильтрации излучения которого использовался светофильтр 2 (пропускание в диапазоне 450-490 нм). Для отражения излучения светодиода на плоскость чипа 1 использовали дихроичное зеркало 3, которое было прозрачно для флуоресцентного излучения пробы. Регистрация флуоресценции после выделения спектрального диапазона светофильтром 6 (пропускание в диапазоне 520-560 нм) производилась при помощи цифровой ПЗС-камеры 7, а оцифрованный сигнал выводился на компьютер 13. Полученные оптические характеристики системы детектирования позволяют проводить одновременное детектирование флуоресцентных аналитических сигналов от всех микрореакторов микрочипа топологии 2 и 9 микрореакторов микрочипа топологии 3. Предел обнаружения микрофлюидной аналитической системы составил  $5 \times 10^{-9}$  М по буферному раствору флуоресцеина.

Вторая часть главы посвящена разработке системы термоциклирования. Созданная система (см. рис 2) включала элемент Пельтье 9, на активной стороне которого закреплялся платиновый термодатчик 10, а на обратной стороне - радиатор 8. В систему термоциклирования входит также пластиковый картридж 11, в который помещался ПЦР микрочип 5. Изменение мощности, подаваемой на элемент Пельтье, и считывание показаний термодатчика осуществляли при помощи платы микроконтроллера 12 и компьютера 13. Скорость нагрева модельной смеси, оцененная как контактным, так и бесконтактным способами, составляет  $8.7$  °C/с, а максимальная скорость охлаждения -  $7.8$  °C/с. Полученные значения в 5-6 раз превышают скорости нагрева/охлаждения, достигаемые на стандартном ПЦР оборудовании.

В результате, достигнутые характеристики созданной системы находятся на уровне лучших аналогов, что в принципе позволяет экспрессно и высокочувствительно проводить определение ДНК в микрореакторах ПЦР микрочипа методом ПЦР-РВ.



Третья часть главы описывает приготовление модельных растворов родамина и флуоресцеина, а также методики модификации поверхности кремниевых пластин и ПЦР микрочипа. Представлены методики очистки микрореакторов микрочипа после проведения ПЦР, а также описаны разработанные при проведении экспериментов установки: установка для визуализации данных гель-электрофореза и установка для очистки ПЦР микрочипов.

Приведены описания использованных в работе ПЦР тест-систем и используемые режимы амплификации. Приведен используемый метод расчета величины порогового цикла реакции ( $C_t$ ) – важного аналитического параметра ПЦР-РВ реакции. Расчет  $C_t$  осуществлялся по максимуму второй производной четырехпараметрической логической модели (ЧПЛИМ), которая использовалась для приближения экспериментальных ПЦР кривых. Так как экспоненциальная фаза кинетической кривой ПЦР-РВ описывается уравнением 1

$$N_{\text{ДНК}}^n = N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} E^n, \quad (1)$$

где  $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$  - исходная концентрация ДНК в пробе,  $N_{\text{ДНК}}^n$  - концентрация ДНК к циклу  $n$ ,  $E$  - эффективность реакции, то, определив величину порогового цикла реакции ( $C_t$ ), можно оценить исходную концентрацию ДНК в пробе, используя связь этих величин по уравнению (2)

$$C_t = - \left[ \frac{1}{\log E} \right] \times \log N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} + \frac{N_{\text{ДНК}}^0}{\log E}, \quad (2)$$

#### 4 ПЦР-АНАЛИЗ В СТЕКЛЯННО-КРЕМНИЕВОМ МИКРОЧИПЕ

Глава посвящена оптимизации методов ввода проб в микрочип, герметизации микрочипа для предотвращения испарения и движения жидкости, выбору оптимального пассивирующего покрытия микрореакторов, позволяющего минимизировать ингибирование ПЦР и поиску экспрессных и эффективных способов очистки микрореакторов ПЦР микрочипа после проведения ПЦР.

При проведении экспериментов было предложено несколько способов ввода проб, основанных на создании разряжения на выходных отверстиях микрочипа, однако, только способ, основанный на индивидуальном нагнетании проб в микрореактор, позволил исключить испарение проб на входных отверстиях и увеличить воспроизводимость результатов ПЦР.

Для предотвращения движения и испарения проб при проведении термоциклирования использовали минеральное масло, полимерные уплотнители и полиолефиновую пленку. Герметизация минеральным маслом не предотвращала движения проб, а герметизация резиновыми уплотнителями требовала обязательного механического прижима к микрочипу. В ходе работ был найден оптимальный метод герметизации микрочипа при помощи самоклеющейся полиолефиновой пленки. Этот способ позволил предотвратить испарение и движение проб, осуществлять процедуру герметизации с высокой экспрессностью (1,5 мин) и сделать микрочип полностью герметичным, что не позволяли другие опробованные методы.

В литературе показано, что при контакте немодифицированного кремния с ПЦР смесью происходит ингибирование ПЦР. Ингибирование вызывается сорбцией молекул Taq ДНК-полимеразы, а также сорбцией ДНК и праймеров за счет образования водородных связей при наличии на поверхности микрореакторов

силанольных групп. На основании литературных данных были выбраны такие статические пассиваторы, как диметилдихлорсилан  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$ , октадецилдиметилхлорсилан  $\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ , органохлорполисилоксан SigmaCote с общей формулой  $\text{R}-[\text{SiCl}(\text{R})-\text{O}]_n-\text{SiCl}(\text{R})_2$ , где R – алкильная группа (см рис 3 а), полиадениловая кислота, бычий сывороточный альбумин (БСА). Статическая модификация силанами и силоксанами устраняет сорбцию ДНК за счет покрытия поверхности инертными группами, а применение полиадениловой кислоты и БСА позволяет создать поверхность, с которой компоненты ПЦР смеси взаимодействуют обратимо. Кроме представленных в литературе методов модификации в настоящей работе предложен метод модификации поверхности микрореакторов при помощи полиметилметоксисилоксана (ПММС) Пента-111 с общей формулой  $\text{CH}_3-[\text{Si}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)-\text{O}]_m-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Выбор модификатора связан с представленными в литературе данными о минимальном ингибировании ПЦР полимерными материалами при проведении ПЦР в реакторах полимерных микрочипов. На рис 3 б представлена структура полимерного покрытия, образующегося на поверхности микрореакторов при модификации ПММС Пента-111.

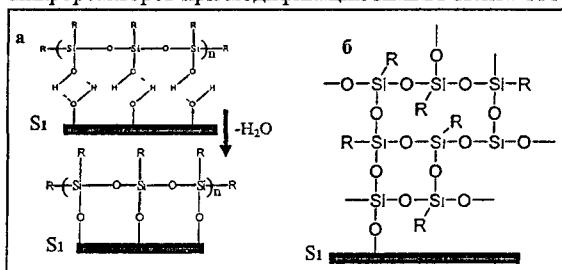


Рис 3 Модификация поверхности кремния с использованием: а SigmaCote (R – алкильная группа) б. ПММС (R – метильная группа)

Также предложен оптимизированный метод модификации силаном, который позволяет равномерно модифицировать поверхность при помощи  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$ . На предварительном этапе исследований использовали модельные системы – кремниевые пластины, которые после проведения модификации помещались в пробирки с ПЦР смесью, затем пробирки помещались в амплификатор (Терцик, ЗАО “ДНК-Технология”), а анализ результатов реакции проводили методом гель-электрофореза. Показано, что добавка БСА в качестве динамического пассиватора в большинстве случаев позволяла увеличить выход ампликонов, что связано с улучшением качества пассивации за счет дополнительного покрытия поверхности микрореакторов слоем БСА. Минимальное ингибирование реакции достигалось при использовании предложенного метода пассивации ПММС, что связано с минимальной инактивацией компонентов ПЦР смеси полимерным материалом.

Проводили выявление сорбирующегося компонента ПЦР смеси, для чего использовали ПЦР смеси, в которых отсутствовали или ДНК и праймеры, или Taq ДНК-полимераза, или все три перечисленных компонента. Смеси помещали в модифицированные микрореакторы чипов, инкубировали 5 мин при 25 °С, извлекали, добавляли недостающий компонент и термоциклировали, а анализ результатов проводили методом гель-электрофореза. Полученные данные свидетельствуют, что при использовании таких модификаторов как  $\text{SiMe}_2\text{Cl}_2$ ,

наблюдается сорбция Taq ДНК-полимеразы, а сорбция ДНК и праймеров минимальна. Применение предложенного в настоящей работе способа модификации ПММС позволяет минимизировать сорбцию всех компонентов на внутреннюю поверхность микрореакторов, что объясняется отсутствием на поверхности создаваемого полимерного покрытия активных групп, с которыми компоненты ПЦР смеси могут необратимо взаимодействовать.

Для проведения ПЦР в микрореакторах микрочипов использовали 3 наиболее перспективных модифицирующих покрытия ПММС,  $\text{SiMe}_2\text{Cl}_2$  и  $\text{SiMe}_2\text{Cl}_2$  после окисления ПММС. Полученные значения величин пороговых циклов  $C_t$  в зависимости от модифицирующего и метода пассивации покрытия приведены в табл 1.

**Таблица 1** Значения  $C_t$ , полученные при проведении ПЦР в микрореакторах ПЦР микрочипа с использованием различных методик пассивации поверхности (исходная концентрация ДНК –  $2 \times 10^5$  копий/мкл, флуоресцентный краситель - SYBR Green I)

| Модифицирующее покрытие и методика пассивации   | $C_t$<br>n=5 | $S_n$ , %<br>n=5 |
|---|--------------|------------------|
| $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$   | 21 57        | 0 29             |
| $\text{CH}_3\text{-[Si(OCH}_3\text{)(CH}_3\text{)-O]}_m\text{-Si(CH}_3\text{)}_3$   | 20 35        | 0 19             |
| $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$ после окисления $\text{CH}_3\text{-[Si(OCH}_3\text{)(CH}_3\text{)-O]}_m\text{-Si(CH}_3\text{)}_3$ | 21 91        | 0 40             |

Как видно из табл 1, минимальное значение  $C_t$ , т.е. минимальное ингибирование ПЦР, достигается при использовании ПММС. Метод пассивации ПММС отличает высокая экспрессность: время на модификацию одного микрочипа составляет всего 7 мин. Также было отмечено, что метод модификации ПММС способствует увеличению гидрофобных свойств поверхности входных отверстий микрочипа, что позволяет предотвратить растекание проб и перемешивание проб при вводе в микрореакторы.

В ходе экспериментов было показано, что при повторном проведении ПЦР после стандартной очистки микрочипа при помощи элюирующего ДНК ТЕ буфера (0,01 М Трис-HCl, 0,01 М ЭДТА, pH=7,8) остаются ампликоны, размноженные при проведении предыдущей реакции. Для устранения эффекта памяти были предложены два способа регенерации поверхности. Первый способ базировался на использовании дезоксирибонуклеазы I катализирующей гидролиз фосфодиэфирных связей в молекуле ДНК. Второй способ - кипячение микрочипов в  $\text{HNO}_3$ , основан на полном разрушении ампликонов. В случае успешной регенерации достигается равенство пороговых циклов, полученных при одной и той же исходной концентрации ДНК в заведомо чистом и отмытом микрореакторе, т.е.  $\Delta C_t = 0$ . Обнаружено, что при использовании первого способа регенерации, при повторном проведении ПЦР в очищенном микрореакторе  $\Delta C_t = 2,2$ , что свидетельствует о неполной регенерации микрореактора. При использовании второго способа получено, что  $\Delta C_t = 0$ , что доказывает полноту регенерации. После очистки микрочипа происходит разрушение пассивирующего полимерного покрытия, поэтому для последующего анализа необходимо его повторное нанесение. Предложенный нами способ очистки позволяет использовать микрофлюидные чипы многократно, что увеличивает доступность анализа.

Предложенные в настоящей главе способ дозирования проб, методики экспрессной герметизации микрочипов, многократной модификации и регенерации поверхности микрореакторов создают условия для осуществления ПЦР-РВ в микрореакторах микрофлюидного чипа и позволяют проводить исследования, используя ограниченное количество ПЦР микрочипов

## 5 ПЦР-АНАЛИЗ В МИКРОРЕАКТОРАХ ПЦР МИКРОЧИПА ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОТЕКАНИЯ РЕАКЦИИ И СРАВНЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СОЗДАННОЙ МИКРОЧИПОВОЙ СИСТЕМЫ СО СТАНДАРТНЫМ ОБОРУДОВАНИЕМ

Побочные реакции при проведении ПЦР, обусловлены неточностью поддержания температур, наличием температурного дрейфа, погрешностью работы Taq ДНК-полимеразы, неоптимизированной последовательностью праймеров и наличием в пробе большого количества инородной ДНК, полученной в результате пробоподготовки пробы. Все это может приводить к ложноположительным результатам ПЦР-анализа. Селективность детектирования целевого продукта повышается при использовании флуоресцентных зондов с флуорофорами, флуоресцирующих только в случае размножения интересующего фрагмента. Была проведена оценка чувствительности определения ДНК при использовании неспецифичного интеркалятора SYBR Green I и флуорофора FAM, и показано, что пороговый цикл при использовании зонда достигается на 5 циклов позже. Это связано с механизмом генерации репортной флуоресценции в случае SYBR Green I на 6 п.о. ампликона приходится одна молекула красителя, а в случае зонда FAM на один размноженный ампликон приходится один высвобождающийся флуорофор. Следовательно, чувствительность детектирования в случае использования зондов ниже.

В работе экспериментально были смоделированы условия, при которых возможно протекание побочных реакций, для чего снизили температуру на стадии синтеза ДНК на 1,5 °С. В созданных условиях, при использовании неспецифичного интеркалятора достигается более поздняя величина  $C_t$ , а на кривых плавления наблюдаются пик плавления целевого продукта и пик плавления, соответствующий димерам-праймеров. Большая величина  $C_t$ , по-видимому, связана с тем, что длина размножающихся побочных продуктов меньше длины целевого ампликона. Таким образом, при малой исходной концентрации ДНК в пробе с использованием SYBR Green I вероятность получения ложноположительного результата выше, поэтому после окончания реакции необходимо проводить плавление, что снижает экспрессность определения ДНК. Устранить этот эффект позволяет использование флуоресцентных зондов в отсутствии положительного контрольного образца. Пороговый цикл не достигался к 50 циклу амплификации. Таким образом, использование флуоресцентных зондов оправдано для повышения селективности определения ДНК методом ПЦР-РВ, несмотря на более позднее достижение  $C_t$ . При помощи флуоресцентного интеркалятора показано, что при поддержании рекомендованной температуры на стадии синтеза ДНК, в созданной микрофлюидной аналитической ПЦР-РВ системе происходит размножение только целевого продукта, а его плавление происходит одновременно во всех микрореакторах, что

характеризует равномерное распределение температуры между микрореакторами и об отсутствии побочных реакций в процессе термоциклирования

Для оценки аналитических характеристик созданной микрочиповой системы проводили ПЦР как в микрочипе, так и на стандартном ПЦР-РВ оборудовании - анализаторе нуклеиновых кислот – АНК-16 (МГТУ им Н Э Баумана, ЗАО “Синтол”, ИнАП) Вид ПЦР кривых, полученных на стандартном оборудовании и значения  $C_t$  для разных концентраций ДНК приведены на рис 4 и в таблице 2. Оценку эффективности ПЦР-РВ в микрореакторах микрочипа для созданной микрочиповой системы и стандартного оборудования проводили с помощью построения градуировочных графиков в координатах  $C_t - \lg(N_{ДНК}^{исх})$  с помощью метода наименьших квадратов

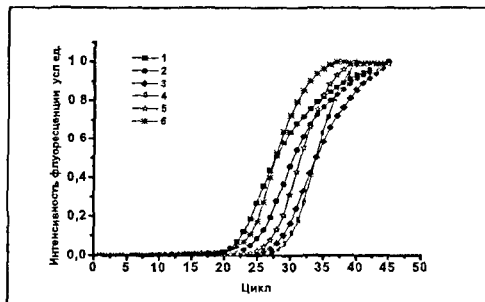


Рис 4 ПЦР кривые, полученные при проведении ПЦР на стандартном оборудовании (АНК) и в микрореакторах ПЦР микрочипа при различной исходной концентрации ДНК 1- АНК,  $2 \times 10^5$  копий/мкл, 2- АНК,  $2 \times 10^4$  копий/мкл, 3- АНК,  $2 \times 10^3$  копий/мкл; 4- ПЦР микрочип,  $2 \times 10^5$  копий/мкл; 5- ПЦР микрочип,  $2 \times 10^4$  копий/мкл, 6- ПЦР микрочип,  $2 \times 10^3$  копий/мкл.

Таблица 2. Оценка величины  $C_t$  при проведении ПЦР в микрореакторах микрочипа и на стандартном оборудовании в зависимости от исходной концентрации ДНК в пробе ( $N_{ДНК}^{исх}$ ), копий/мкл

| Термоциклирование | $N_{ДНК}^{исх}$ ,<br>копий/мкл | $C_t$<br>n=5 | $S_r$ , %<br>n=5 |
|-------------------|--------------------------------|--------------|------------------|
| АНК               | $2 \times 10^5$                | 24 65        | 0 09             |
|                   | $2 \times 10^4$                | 27 86        | 0 11             |
|                   | $2 \times 10^3$                | 30 83        | 0 12             |
| ПЦР микрочип      | $2 \times 10^5$                | 25 35        | 0 18             |
|                   | $2 \times 10^4$                | 28 35        | 0 20             |
|                   | $2 \times 10^3$                | 31 50        | 0 20             |

Большой угол наклона ПЦР кривых в микрочипе связан с тем, что малый объем реакторов минимизирует температурные неоднородности и ускоряет массоперенос, по сравнению с полипропиленовыми пробирками. Поэтому на ранних стадиях эффективности ПЦР, полученных в АНК и в микрочипе равны теоретическому пределу, а на более поздних стадиях эффективность ПЦР в микрочипе выше, что и приводит к быстрому достижению плато ПЦР кривой.

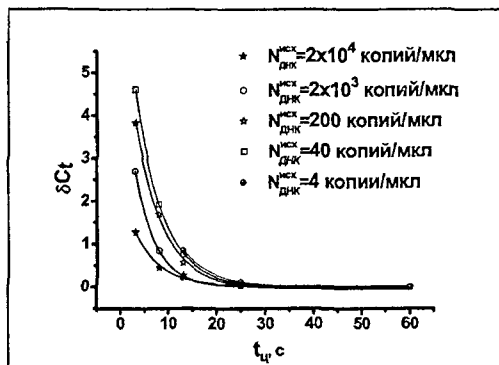
Большая величина  $C_t$  в микрочипе объясняется незначительной сорбцией праймеров и зондов на поверхность микрореакторов, что также приводит к более раннему достижению плато. Так как время достижения плато лимитирует время анализа, то, при прочих равных условиях, анализ в микрочипе будет экспресснее. Так как эффективности ПЦР для стандартного оборудования и для созданной

микрочиповой системы равны, то ингибирование реакции в микрочиповой системе устранено. Показано, что время, затрачиваемое на 1 цикл амплификации, в созданной системе составляет всего 66 с, что в 15 меньше, чем аналогичная процедура в пробирках на АНК. Построенные градуировочные зависимости показали, что в созданной микрочиповой ПЦР-РВ системе достигнута теоретически максимально возможная эффективность реакции, т.е. максимальная чувствительность аналитической системы, при этом минимальное детектируемое количество молекул ДНК составило 1 копию на микрореактор.

Отметим, что время поддержания температуры, указываемое производителем ПЦР реактивов в рекомендуемом режиме амплификации, оптимизировано для пробирок и используемого стандартного оборудования. Известно, что для таких систем наблюдаются неоднородности распределения температур внутри пробирки, что связано с большим объемом смеси и малыми коэффициентами теплопроводности материала пробирок. В микрочиповой системе увеличивается однородность распределения температуры за счет малой глубины микрореакторов и высоких коэффициентов теплопроводности материала. Была выдвинута гипотеза, что снижение времени поддержания температур на стадиях синтеза и денатурации ДНК не повлечет за собой значительного уменьшения эффективности реакции и позволит достичь высокой экспрессности анализа. Время денатурации при  $T=95\text{ }^{\circ}\text{C}$  сокращали последовательно с 20 до 1 с, время стадии синтеза при  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$  сокращали с 40 до 2 с. Полученные результаты представлены в таблице 3 и на рис. 4.

**Таблица 3** Оценка эффективности реакции и времени достижения  $C_t$  в зависимости от используемого режима амплификации и исходной концентрации ДНК  $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$ , копии/мкл

| Время поддержания температуры в цикле $t_{\text{ц}}$ , с | Время, затрачиваемое на один цикл, с | Время достижения $C_t$ , мин в зависимости от $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$ , копий/мкл |                 |      |      |      | Эффективность реакции |
|--|--------------------------------------|---|-----------------|------|------|------|-----------------------|
|  |                                      | $2 \times 10^4$   | $2 \times 10^3$ | 200  | 40   | 4    |                       |
| 60 (20+40)   | 72                                   | 27.4  | 31.8            | 35.3 | 38.5 | 43.3 | 1.99                  |
| 25 (5+20)  | 36                                   | 13.9  | 16.1            | 18.1 | 19.9 | 21.8 | 1.99                  |
| 13 (3+10)  | 24                                   | 9.3   | 10.8            | 12.2 | 13.3 | 14.8 | 1.90                  |
| 8 (3+5)  | 19                                   | 7.5   | 8.7             | 10.2 | 11.2 | -    | 1.72                  |
| 3 (1+2)  | 14                                   | 5.7   | 6.9             | 7.8  | 8.7  | -    | 1.61                  |



**Рис. 4.** Изменение величины  $C_t$  в зависимости от времени поддержания температуры в цикле ( $t_{\text{ц}}$ ), при проведении ПЦР по стандартному и ускоренным режимам амплификации в микрореакторах ПЦР микрочипа

Как видно из представленных данных, при уменьшении времени поддержания температуры увеличивается величина  $C_t$  и снижается время достижения  $C_t$ , а при значительном уменьшении времени поддержания температуры уменьшается эффективность реакции. Из табл. 3 видно, что при уменьшении времени поддержания температуры в 4,6 раза величина порогового цикла уменьшилась в среднем всего на 0,4 - 0,8 ед., а время достижения порогового цикла сократилось в 3 раза, по сравнению со временем достижения порогового цикла в случае использования рекомендуемого производителем режима амплификации.

Увеличение порогового цикла при сокращении времени поддержания температуры происходит вследствие кинетических ограничений, из-за которых Taq ДНК-полимераза не успевает достроить ампликон соответствующей длины, поэтому режим термоциклирования 95 °С - 3 с, 60 °С - 10 с близок к теоретически возможному минимальному времени термоцикла и был признан оптимальным. Применение предложенного режима амплификации позволяет осуществлять количественное определение 5 копий ДНК в микрореакторах микрочипа всего за 18 мин при высокой эффективности реакции равной 1,90. Достигнутое время определения ДНК в созданной микрофлюидной ПЦР-РВ системе в 4,5 раза меньше, чем время, затрачиваемое на проведение определения ДНК на стандартном оборудовании по рекомендуемому режиму амплификации.

Для оценки правильности разработанной методики использовали два стандартных образца (СО) ДНК Градуировочные зависимости, представленные на рис. 6, получены с помощью стандартного и оптимального ускоренного режимов амплификации.

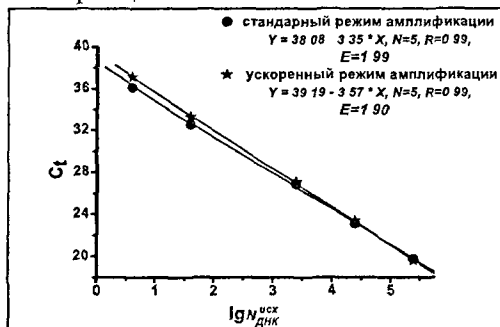


Рис. 6 Градуировочные графики, полученные при проведении ПЦР в микрореакторах ПЦР микрочипа по стандартному и ускоренному режимам амплификации для ПЦР тест-системы для определения вируса гепатита С.

Результаты анализа стандартных образцов по стандартному и ускоренному режимам амплификации приведены в табл. 4

Таблица 4 Анализ стандартных образцов

| Номер СО | $N_{\text{ДНК}}^{\text{уск}}$ в СО, копий/мкл | Полученная $N_{\text{ДНК}}^{\text{уск}}$ , копий/мкл (стандартный режим амплификации) $n=5, P=0,95$ | Полученная $N_{\text{ДНК}}^{\text{уск}}$ , копий/мкл (ускоренный режим амплификации) $n=5, P=0,95$ |
|----------|---|---|--|
| 1        | 200   | 210±30  | 220±38   |
| 2        | 500   | 495±71  | 508±75   |

Как видно из представленных в табл 4 результатов, полученные значения по стандартному и ускоренному режимам амплификации, совпадают со значениями концентраций ДНК, заявленными в паспорте стандартов, что говорит о правильности разработанной методики

Таким образом, в пятой главе было показано, что созданная микрофлюидная аналитическая система позволяет проводить селективное и высокочувствительное определения ДНК по разработанной методике экспрессного ПЦР-РВ анализа

## ВЫВОДЫ

- 1 Оптимизирована топология мультиреакторного ПЦР микрочипа, что позволило увеличить производительность системы Разработаны способы экспрессного ввода проб и герметизации микрочипа Разработан способ регенерации поверхности микрореакторов, который позволяет многократно использовать ПЦР микрочип
- 2 Разработана методика пассивации поверхности микрореакторов, обеспечивающая минимизацию сорбции компонентов ПЦР смеси, что позволило достичь теоретически максимально возможной чувствительности разработанной аналитической системы Минимальное детектируемое количество молекул ДНК составило 1 копию на микрореактор
- 3 Разработана мультиреакторная микрофлюидная аналитическая система, позволяющая проводить определение ДНК методом ПЦР-РВ, с близкими к теоретически возможным минимальными временами термоцикла
- 4 Разработана методика экспрессного определения ДНК, оценены ее правильность и воспроизводимость с использованием тест-системы для определения вируса гепатита С Время анализа составило всего 18 мин, что в 4,5 раза быстрее, по сравнению со стандартным методом

*Основные материалы диссертации опубликованы в следующих работах:*

- 1 Щербаева, М.В. Система детектирования для микрофлюидных чипов на принципах эпифлуоресцентной видеомикроскопии и ее аналитические возможности [Текст] / М Н Сляднев, В А Казаков, А А Ганеев, Л Н Москвин, Ю А. Золотов // Журнал аналитической химии - 2005 - Т 60 - № 4 - С 357-366
- 2 Лаврова, М В. Микрочиповая мультиреакторная система для биохимического анализа [Текст] / М Н Сляднев, В А Казаков, А А Ганеев, Л Н Москвин // Научное Приборостроение - 2005 - Т 15 - № 2 - С 41-50
- 4 Lavrova, M V. Surface Modification of Microchip Input Reservoirs for Pressure-induced Sample Injection into Microreactors [Text] / V A Kazakov, A A Ganeev, L N Moskvina, M N Slyadnev // Analytical Sciences - 2005 - V 21 - No 4 - P 293-294
- 5 Scherbayeva, M A Development of a CCD-based Fluorescence Imaging Detector for Multiplex PCR System on a Microchip [Text] / M Slyadnev, V Kazakov, A Ganeev // Colloquium Spectroscopicum Internationale CSI XXXIII Granada (Spain), 7-12 September 2003 - MO-O-18 - P 35
- 6 Щербаева, М В Флуориметрический детектор для микрофлюидных систем [Текст] / М Н Сляднев, В А Казаков, А А Ганеев, Л Н Москвин // Тез докл V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003» Санкт-Петербург - 6-10 октября - 2003 - С 83
- 7 Щербаева, М.В. Микрочиповые аналитические системы для биохимической и медицинской диагностики [Текст] / М Н Сляднев, В А Казаков, А А Ганеев // Тез



докл V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003» Санкт-Петербург - 6-10 октября - 2003 - С 84

8 Щербаева, М.В Микрофлюидные аналитические системы для жидкостно-жидкостной экстракции [Текст] / М.Н. Сляднев, В.А. Казаков, А.А. Ганеев, Л.Н. Москвин // Тез докл Всероссийской конференции «Аналитика России-2004» Москва 27 сентября - 1 октября - 2004 - С 95

9 Щербаева, М.В. Бесконтактный нагрев жидкости и контроль температуры в микрочиповом ПЦР-анализаторе [Текст] / М.Н. Сляднев, В.А. Казаков, А.А. Ганеев // Тез докл Всероссийской конференции «Аналитика России-2004» Москва 27 сентября - 1 октября - 2004 - С 99

10 Scherbayeva, M.V Development of a Microchip Real-Time PCR System with a Fluorescence Imaging Detector [Text] / V.A. Kazakov, A.A. Ganeev, M.N. Slyadnev, L.N. Moskvina // Pittcon`2005 Orlando (FL, USA) - 27 Feb - 04 March - 2005 - P 910

11 Lavrova M.V Development of a microchip real-time PCR system for rapid DNA analysis [Text] / V.A. Kazakov, A.A. Ganeev, M.N. Slyadnev // International congress of analytical sciences Moscow 25-30 June - 2006 - P 258

Подписано в печать 24.04.07. Формат 60x84 1/16  
Бумага офсетная. Печать офсетная.  
Усл. печ. листов 0,93. Тираж 100 экз. Заказ № 19.

ЦОП типографии Издательства СПбГУ  
199061, С-Петербург, Средний пр., д. 41